

## Női sterilitás és ivarosról klónos szaporodásra váltás a növénykórokozó gombákban (Zárójelentés)

A heterothallias aszkomicétákban bipoláris típusú párosodási rendszer működik, azaz a párosodási típust egyetlen lókuszt (*MAT*, *mating*) határozza meg, amelynek két idiomorf allélja van (*MAT1* és *MAT2*). Sikeres ivaros szaporodáshoz két eltérő *MAT*-idiomorfot hordozó partner találkozására van szükség. A *mat* gének közül kettő, a *mat1-1-1* és a *mat1-2-1* transzkripciós faktorokat kódol, mely faktorok eddig azonosított célgénjei az ivari kommunikációért felelős feromon-prekurzor, illetve feromon-receptor gének. Korábbi kutatásaink azonban rámutattak arra, hogy a *mat* gének valószínűleg nemcsak a feromon-kommunikációt szabályozzák, hanem a párosodáson túlmenően fontos szerepet töltenek be a gomba életciklusának aszexuális fázisában is. Több mint 200 olyan EST szekvenciát találtunk ugyanis, amely szekvenciák eltérő szinten expresszázódtak a *Fusarium verticillioides* vad típusú törzsében és az ebből, gén-diszrupcióval előállított  $\Delta FvMAT1-2-1$  mutánsban. Mindez azt jelenti, hogy a *mat* gének, illetve a *MAT* transzkripciós faktorok egyéb, a vegetatív életciklusban fontos szerepet betöltő génekre is hatással vannak [Keszthelyi *et al.* (2007): *Antonie van Leeuwenhoek* **91**, 373-391]. Ennek azért van jelentősége, mert a heterothallias gombák világában gyakori jelenség a női sterilitás, amely fontos lépés a klónos szaporodási formára történő átváltásban. Ez a reprodukciós stratégia – amely sok növénykórokozó gombában előfordul – azért lehet előnyös, mert klónos szaporodás során a virulenciát kódoló gének nem hígulnak ki a populációból. A női sterilitás kialakulásának genetikai háttere teljesen ismeretlen, nem tudjuk, milyen gének működésének megváltozása vezet ehhez a jelenséghez. Ebben a kutatási programban azt tűztük ki célként, hogy molekuláris genetikai eszközökkel igazoljuk néhány, ilyen tekintetben eddig ismeretlen gén szerepét a női sterilitásban és az ivarosról klónos szaporodásra történő váltásban. A kísérleteket a *Gibberella fujikuroi* gyűjtőfaj biológiai fajain, a *F. verticillioides*-en (teleomorf: *Gibberella moniliformis*), a *Fusarium fujikuroi* (*Gibberella fujikuroi*) és a *Fusarium proliferatum*-on (*Gibberella intermedia*) végeztük; mindhárom faj fontos növénykórokozó, mikotoxinokat és egyéb másodlagos metabolitokat termelő gomba.

Kísérletes megközelítésünk a következő volt: kiválasztottunk néhány fontosnak tűnő EST klónt a Keszthelyi *et al.* (2007) gyűjteményből, izoláltuk a teljes géneket, majd ezeket a géneket inaktiváltuk a vad típusú törzsben, és megvizsgáltuk, milyen fenotípusos változást eredményez a gén-diszrupció. A változásokat elemezve pedig megpróbáltunk fényt deríteni arra, milyen gének túlműködése vagy alul-reguláltsága vezethet klónos szaporodáshoz. Egy másik megközelítésben kvantitatív rt-PCR segítségével hasonlítottuk össze gének expresszióját *mat* null-mutánsokban és a vad típusú szülő törzsben.

Az egyik EST klón (a 265. sz. singleton), amely határozottan alul-regulálódott a  $\Delta FvMAT1-2-1$  null-mutáns törzsben opsin génekkel mutatott homológiát, egy másik, a mutánsban ugyancsak gyengén működő klón (a 241. sz. singleton) pedig az ún. white collar génekkel volt rokon. Ebből arra lehetett következtetni, hogy a működőképes *mat* gének stimulálják a fényregulációt irányító géneket. Ezt a feltételezést az is erősítette, hogy a fény által indukált karotenogenezis jelentős gátlást szenvedett a  $\Delta FvMAT1-2-1$  knock-out mutáns törzsekben; a poláros (neurospoxanthin) és a nem-poláros ( $\beta$ - és  $\gamma$ -karotin prekurzorok) karotinoidok mennyisége egyaránt lényegesen kisebb volt a mutánsokban, mint a vad típusban. A karotin-bioszintézisben alapvető szerepet játszó

három gén, a fitoén prekursor előállításáért felelős *carRA* (bifunkcionális fitoén szintáz/karotin cikláz), a szénlánc fokozatos telítetlenítéséért felelős *carB* (fitoén deszaturáz) és a *carT* (karotin oxigenáz) expressziója eltérő görbét mutatott megvilágítás hatására a vad, illetve a  $\Delta FvMAT1-2-1$  mutáns törzsekben. A vad típusban ezek a gének megvilágítás hatására közel ezerszeres expresszió növekedéssel reagáltak, s a magas expressziós szintjük négy órán át fennmaradt, míg a mutánsokban csak kétszázszoros növekedés volt kimutatható, s két óra megvilágítás után ez le is csengett [Ádám *et al.* (2011): *FEMS Microbiology Letters* **318**, 76-83].

A white collar gének (*wc1* és *wc2*) onnan kapták a nevüket, hogy *Neurospora*-ban a *wc*-mutánsok telepeinek fehér szegélyük van. (Ez azért van így, mert a mutánsokban csak a konídiumokban termelődik karotin, a micéliumban nem, tehát a konídiumtermelő sejtek fehérek maradnak, s mikroszkóp alatt mindez úgy néz ki, mintha a sötét sárga konídiumok „fehér nyakon” ülnének.) *Neurospora*-ban a *wc* gének által kódolt WCC (white collar complex) fehérje meghatározó szerepet játszik a fény-jelátvitelben, részt vesz az összes fényfüggő folyamat, így a napszakos ritmus szerinti növekedés, a karotinoid bioszintézis, a fotoindukált konídiumképzés, a perithécium-fejlődés és az aszkospóra kilökődés szabályozásában. A WCC-t kódoló mindkét *wc* gént (*Fvwcl* és *Fvw2*) klónoztuk *F. verticillioide*sből, és *wc* hiány-mutánsokat állítottunk elő irányított gén-diszrupcióval. Bármelyik *wc* gén inaktiválása teljes női sterilitással járt, de a mutánsok him-fertilitása és ivartalan spóra-termelése (konídiumképzés) nem gyengült a vad típuséhoz képest. Nem romlott a mutánsok növényi szövetekben mutatott inváziós képessége sem, amit paradicsombogyókon vizsgáltunk. Mindkét *wc* gén expressziója közepes mértékű volt a sötétben tartott vad törzsekben, s amikor fényre vittük a tenyészeteket, csak kismértékű expresszió-növekedést tapasztaltunk. Mind az *Fvwcl*, mind pedig az *Fvw2* alul-regulálódott a  $\Delta FvMAT1-2-1$  mutáns törzsekben, ami arra utal, hogy a MAT transzkripció faktor nemcsak a karotin bioszintézis gének működését stimulálja, hanem a fény-receptor WCC komplexet kódoló *wc*-généket is, s ezen keresztül növeli az ivartalanul szaporodó gombák fitnessét. Ezért fontos tehát az, hogy az ivaros reprodukciót felfüggesztő, klónos szaporodásra váltó gombákban is működjenek a *mat* gének, mert ezek a gének képesek erősíteni olyan folyamatokat, amelyekre szükség van a klónos szaporodás során is [Bodor *et al.* (2013): *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **48**, in press].

A  $\Delta FvMAT1-2-1$  mutáns törzsek átlagosan 60%-kal kevesebb konídiumot termeltek sárgarépa táptalajon, mint a vad típusú szülő törzs, akár állandó sötétben, akár 12/12-órás sötét-fény váltás mellett történt a tenyésztés. A mutánsokban a konidiálás-specifikus *con10* gén expressziója – fénytől független módon – drasztikusan csökkent a vad típusban mért expresszióhoz képest. Ezek a vizsgálatok azt bizonyították, hogy a *mat* gének nemcsak az ivaros folyamatokat befolyásolják, hanem az ivartalan sporulációra is pozitívan hatnak. Kiderült tehát, hogy az ivartalan fejlődési szakasz egy másik fontos fitness-tulajdonságát, az aszexuális sporulációt is kedvezően befolyásolják a *mat* gének, s ez által is támogatják a klónos szaporodás fennmaradását [Bodor *et al.* (2013): *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **47**, 7-15].

A EST gyűjteményben (Keszthelyi *et al.* 2007) a *mat* null-mutánsban alul-regulálódott klónok 32,5%-a a jelátvitelben és a sejt–sejt kommunikációban résztvevő génekkel mutatott szekvencia-hasonlóságot! Az EST-k között azonosítottunk, többek között, szerin/tryptophan kináz (141. és 146. sz. singleton), protein-foszfátáz (207. sz.

singleton), MAPkináz (69. és 263. singleton) és hisztidin-kináz (271 sz. singleton) szekvenciákat. Mindez azt sugallta, hogy a jelátviteli folyamatok zavara is megváltoztatja a reprodukciós stratégiát, és támogathatja az ivarosról klónos szaporodásra történő váltást. Gombákban három fő jelátviteli útvonal működik: (i) a HOG (**h**igh **o**smolarity **g**lycerol) típusú MAPK (**m**itogen **a**ctivated **p**rotein **k**inase) útvonal (korábbi terminológia szerint YERK1, yeast and **e**xtracellular **r**egulated protein **k**inase), (ii) a CWIS (**c**ell **w**all **i**ntegrity signaling) MAPK útvonal (korábban YERK2) és (iii) az adenilát-cikláz – protein kináz A (cAMP-PKA) útvonal. Az már mások korábbi munkáiból ismert volt, hogy a CWIS MAPK útvonal hibája aszkomicétákban az ivaros szaporodásra való képesség elvesztésével jár, de a jelátvitellel kapcsolatba hozható EST-k nagy tömege arra utalt, az ivarosról klónos szaporodásra történő váltásban a másik két jelátviteli útvonal zavara is szerepet játszhat.

Ezt mindenképpen tisztázni szerettük volna, ezért háromféle mutánst készítettünk: a  $\Delta Fphog1$  mutánsokban a HOG MAPK-t kódoló *hog1* gént, a  $\Delta Fvmpk2$  mutánsokban a CWIS MAPK gént, a  $\Delta Fpac1$  mutánsokban pedig az adenilát-cikláz gént szakítottuk meg higromicin-foszfotranszferáz kazetta beépítésével. Így külön-külön vizsgálhattuk, milyen fenotípusos változásokkal jár a három fő jelátviteli útvonal valamelyikének a kiiktatása.

A HOG1 gén-diszrupciós mutánsok só- és ozmózis-stresszre való érzékenysége jelentősen megnőtt. Ezek a törzsek kisebb mértékű stresszre is érélyes programozott sejthalállal (PCD) válaszoltak és egyúttal elvesztették női fertilitásukat. Gyorsított videomikroszkópos felvételekkel elsőként rögzítettük az apoptózisos sejthalált szenvedő gombasejtekben a sejtmag dezintegrációját, mely jelenséget – emlős sejteken végzett kísérletek eredményeként – apoptózisos haláltáncként ismeri az irodalom. A stresszválasz szignálásában döntő szerepet játszó HOG1 típusú MAP-kináz útvonalban sérült  $\Delta Fphog1$  mutánsokban só-stressz esetén nagyon gyorsan, mintegy 20 perc alatt lezajlott a haláltánc, míg ólommal (50  $\mu$ M) kiváltott stressz esetén 2-3-órás haláltáncot lehetett megfigyelni [Nagy *et al.* (2010): *DNA and Cell Biology* **29**, 249-259.]

Az *Fpac1* adenilát-cikláz (AC) gént *F. proliferatum*-ból izoláltuk a gomba genomi könyvtárának szűrésével; a szűrés egy PCR-rel felsokszorozott DNS fragmentummal történt, mely fragmentumot más gombákból ismert *ac* szekvenciák katalitikus domént kódoló szakaszára terveztünk. A teljes *Fpac1* gén hossza 5 850 nt, amely egy 2 536 nt hosszú nyitott leolvasási keretet, négy intront és öt exont tartalmaz. A származtatott FpACY1 fehérje 1 658 aminosavat tartalmaz, és 53-77%-os azonosságot mutat más gombákból ismert (ugyancsak származtatott) AC fehérjékkel. A  $\Delta Fpac1$  mutánsok vegetatív növekedése, konídium-csírázása és agresszivitása gyengült, sporulációjuk viszont erősödött. A mutánsokban megszűnt a szülőtörzsre jellemző vegetatív ön-inkompatibilitás, ami arra utal, hogy a túl-érzékeny idegen felismerést a cAMP-PKA útvonal szignálja fonalas gombákban. A mutánsok hím-fertilitása nem csökkent, s bár a női fertilitásuk lényegesen gyengült, a mutánsok nem váltak teljesen női sterillé. Ez jelentős új felismerés, hiszen azt igazolja, hogy az ivaros kommunikáció jelátvitelében ez a szignál transzdukciós útvonal nem játszik döntő szerepet! Stressz-faktorokkal szemben drasztikusan megváltozott a mutánsok viselkedése: hő- és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-toleranciájuk fokozódott, de nehézfémekkel szemben érzékenyebbé váltak, mint a vad típusú szülőtörzs. Jelentősen nőtt továbbá a mutánsok bikaverin termelése. Az AC jelátviteli útvonalban sérült mutánsokban tehát csak részlegesen romlott az ivaros szaporodásra való készség, az klónos szaporodás során fontos fitness-tulajdonságok (növekedés, konídium-csírázás,

agresszivitás) pedig általában gyengültek; egyedül az ozmotikus stresszel szembeni tolerancia erősödött a mutánsokban [Kohut *et al.* (2010): *Journal of Basic Microbiology* **50**, 1-12.]

Váratlan, előre nem kalkulálható eredmény volt az, hogy a *F. proliferatum*  $\Delta Fpac1$  mutánsainak bikaverin termelése fokozódott, s elég érdekes is ahhoz, hogy kiterjesszük ezeket a kísérleteket a *G. fujikuroi* egy másik biológiai fájára, a *F. fujikuroi*-ra, amely többféle, a biotechnológiai iparban fontos másodlagos metabolitot termel, így gibberellineket, bikaverint és karotenoidokat. Ebben a gombában is inaktiváltuk az *ac* gént, és vizsgáltuk az így létrehozott, a cAMP-PKA jelátviteli útvonalban hibás mutánsok fenotípusát. Az *ac* null-mutáció a *F. fujikuroi*-ban is fitness-hibákat okozott, lassult a vegetatív növekedés, és gyengült a karotin- és gibberellin-termelés. A *F. proliferatum*  $\Delta Fpac1$  mutánsai esetében tapasztaltakkal ellentétben viszont, a *F. fujikuroi*  $\Delta FfacyA$  (= *ac1*) mutánsainak nem nőtt az ozmotikus stresszel szembeni toleranciájuk. Ugyanakkor, ezek a mutánsok is túltermeltek egy sötétvörös pigmentet, valószínűsíthetően új bikaverin származékot. A szignál transzdukciós útvonalak három, közel rokon *Fusarium*-fajban történt vizsgálata rávilágított a stressz-jelátvitel összetett voltára. Különösen igaza ez az oxidatív stressz jelátvitelére, amelyben két MAPK-kaszkádon, a HOG1 és a CWI útvonalon kívül a cAMP-PK útvonal is részt vesz, bonyolult kölcsönhatások hálózatát képezve, amely hálózat gombafajtól függően működik. Az oxidatív stresszorok egyike, a metilglioxál, amely a glikolízis toxikus mellékterméke mind a HOG1, mind pedig a CWIS MAPK útvonalon keresztül szignálódik a *F. verticillioides*-ben. Ez a két MAPK útvonal a másodlagos anyagcsere-termékek termelését is szabályozza különböző *Fusarium*-fajokban. A MAPK útvonalak és a cAMP-PKA útvonal együttműködése miatt nagyon sokoldalú az oxidatív stressz és a másodlagos anyagcsere termékek termelődésének szignálása még a közel rokon *Fusarium*-fajokban is, ami arra utal, hogy a stressz szignálása nagyon gyors evolúciónak van kitéve, és a fejlődés nem filogenetikai alapon, hanem nich-specifikusan történik. [García-Martínez *et al.* (2012): *PLoS One*, **7**, e28849.] Talán ennél is fontosabb azonban az a felismerés, hogy a stresszt-választ közvetítő jelátviteli útvonalak hibája következtében fokozódhat gyógyszeripari szempontból jelentős anyagcsere-termékek produkciója; nem kizárt, hogy a jövőben érdemes lesz ilyen mutánsokat használni bizonyos metabolitok ipari léptékben történő termelésére.

A CWIS MAPK útvonalat úgy iktattuk ki, hogy *F. verticillioides*-ben higromicin-foszfitranszferáz gén irányított bevitelével megszakítottuk az *Fvmk2* gént. Egy másik beavatkozással sikerült komplementálni ezt a mutációt úgy, hogy geneticin rezisztenciát hordozó konstrukcióval visszavittük a hiánymutánsokba a működőképes *Fvmk2* gént. Rendelkezésünkre állt tehát (i) a vad típusú törzs, (ii) néhány  $\Delta Fvmk2$  CWIS MAPK hiánymutáns, és (iii) egy R1 törzs, amelyben helyreállt a hiány-mutáció. Amint várható volt, a  $\Delta Fvmk2$  törzsek női sterilek lettek, az R1 törzs pedig visszanyerte fertilitását. A  $\Delta Fvmk2$  mutánsok kissé gyengébben növekedtek, mint a vad típus, továbbá csökkent a sejtfelszíni struktúráik hidrofób jellege. Feltételezésünk szerint a  $\Delta Fvmk2$  mutánsok, és általában, a többi gomba CWIS MAPK mutánsai, azért válnak női sterillé, mert a jelátviteli folyamat diszfunkciója sejtfal-integritási zavarokkal jár. Érdemes volt ezért összehasonlítani, milyen hatással vannak különböző, sejtfalat támadó anyagok a vad törzsrre, a  $\Delta Fvmk2$  mutánsokra és az R1 törzsrre. A caspofungin, amelyről tudott, hogy gátolja a  $\beta$ -1,3-glukán-szintáz enzimet (s így gyengíti a sejtfal integritást) 100  $\mu$ g/ml

koncentrációban is alig gátolta a vad típusú *F. verticillioides* hifa-növekedését, a  $\Delta Fvmpk2$  mutáns növekedését viszont már 0,2-0,5  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú kezelés is jelentősen gyengítette. Más sejtfal-bioszintézist megzavaró anyagokkal (Calcofluor white – 10-15  $\mu\text{g/ml}$ ; Kongóvíz – 5-10  $\mu\text{g/ml}$ ; SDS – 50-100  $\mu\text{g/ml}$ ) szemben is érzékenyebbek voltak a  $\Delta Fvmpk2$  mutánsok, mint a vad típusú törzs. A komplementált törzs (R1) pedig ugyanúgy viselkedett, mint a vad típusú szülőtörzs. A CWIS MAPK útvonal caspofungin-toleranciában játszott szerepét bizonyítja az is, hogy a caspofungin kezelés hatására az *Fvmpk2* MAPK gén expressziója fél órán belül 3,5-4-szeresére nőtt a vad törzsben, míg a calcofluor white kezelés csak kisebb mértékű, bár elhúzódó indukciót okozott. Mivel a kvantitatív rt-PCR vizsgálatokat a *hph*-kazetta inszerciós helyétől „upstream” pozíciójú indítószekvenciával végeztük, lehetőség volt az expresszió vizsgálatára a mutáns törzsekben is, ahol a kezeletlen kontrol esetében is csökkent expressziót, a caspofungin által okozott *Fvmpk2*-indukció elmaradását tapasztaltuk. Ez arra utal, hogy a funkcionális MAPK fehérje közvetve vagy közvetlenül részt vesz önmaga transzkripció szintű regulációjában, mind stresszelt, mind nem stresszelt körülmények között. A további kvantitatív rt-PCR vizsgálatok eredményei igazolták, hogy a caspofungin kezelés hatására a kitin-szintáz 1 (*chs1*) gén kifejeződése *Fvmpk2* MAPK-függő módon aktiválódott, a kitin-szintáz 6 (*chs6*) gén esetében viszont ilyen hatás nem volt kimutatható. A calcofluor white kezelés viszont a *chs6* gén *Fvmpk2* MAPK-függő expresszióját fokozta. A caspofungin a vegetatív növekedésben szerepet játszó *chs1* gén CWI MAPK-függő expressziójára volt hatással, a másik két kitin-szintáz gén (*chs2*, *chs6*) működését ez a szer nem befolyásolta. [Nagygyörgy *et al.* (2011): Role of MAP kinase signaling in secondary metabolism and adaptation to abiotic/fungicide stress in *Fusarium*. In: Fungicides – Beneficial and Harmful Aspects. (ed. N. Thajuddin), InTechWeb, Rijeka, Croatia, pp. 167-178. (ISBN 978-953-307-451-1), valamint egy előkészületben lévő folyóiratcikk.]

Az eredeti tervben szerepelt az a feladat, hogy a sejtfelszíni kölcsönhatásokban, a szekrécióban, a sejt-sejt kommunikációban és a jelátviteli folyamatokban résztvevő géneket azonosítsunk *Gibberella/Fusarium* fajokban génbanki adatok elemzésével.

Miután az MTA-SZIE Mikológiai Kutatócsoportjában sikerült alkalmaznunk dr. Miskei Mártont, az ő szakértelmének köszönhetően elvégeztük a projekt első évéről elmaradt bioinformatikai elemzéseket. Három *Fusarium*-fajnak, a *Fusarium graminearum*-nak, a *Fusarium oxysporum*-nak és a *F. verticillioides*-nek ismert a teljes genomszekvenciája. A nagyfokú, általános genetikai hasonlóságuk ellenére ezek a gombák élesen különböző patogén-stratégiákat alkalmaznak: a fakultatív patogén *F. graminearum* életciklusában hosszú szaprofiton szakasz van, majd a gomba pázsitfűfélék, köztük termesztett gabonafélék kalászkáit fertőzi a virágzáskor; a *F. oxysporum* tipikus tracheomikóta, amely számos vad és termesztett növényfaj edénynyaláb rendszerét támadja meg, míg a *F. verticillioides* endofiton módon él a kukorica szövevényeiben, s csak akkor vált át patogén szakaszra, amikor a növények szeneszcens stádiumba lépnek. Azok a szekvencia-elemzések, amelyeknek potenciális patogenitás-gének szerveződésében meglevő különbségek feltárása volt a célja, egy sor sejtfalbontó enzimgén azonosítását hozták, köztük 1,3- $\beta$ -galaktozidáz, 1,3- $\beta$ -cellobiohidroláz, acetil-xilánészteráz,  $\alpha$ -glükuronidáz,  $\alpha$ -L-arabinofuranidáz,  $\beta$ -glukozidáz,  $\beta$ -xylozidáz, glikozilhidroláz, endo-1,4- $\beta$ -glukanáz, endo-1,4- $\beta$ -xilanáz, exo-arabinanáz, pektin-metilészteráz, poligalakturonidáz és xilozidáz génekét. Szemben a várakozásokkal, nem

volt jelentős különbség e gének előfordulása tekintetében a három gombafaj között, mindhárom fajnak megvan tehát a genetikai kapacitás komplex sejtfalbontó enzimrendszer működtetésére. Másfelől, egyedül a *F. oxysporum*-ban lehetett találni olyan géneket, amelyek nektróizist és etilénképződést kiváltó fehérjéket kódolnak. A patogenitással kapcsolatba hozható gének nem képeztek genomi szigeteket egyik elemzett gombafajban sem. Az ivarosról klónos szaporodásra való váltásban szerepet játszó géneket ilyen megközelítéssel nem lehetett azonosítani, jobb hatékonyságúak voltak – mint fentebb láttuk – a gén-diszrupciós kísérletek és a génexpresszió kvantitatív rt-PCR-rel való vizsgálata, a génbanki adatok elemzése (*genome mining*) azonban nem volt hiábavaló. Debreceni kutatócsoportokkal való együttműködésben elkészítettük a Gomba Stressz-válasz Adatbázist, amely 1 985 igazolt funkciójú stressz-válasz fehérjét tartalmaz. Ez az adatbázis új gombaellenes készítmények és új rezisztencia-nemesítési stratégiák kifejlesztéséhez szolgáltat fontos információkat [Karányi *et al.* (2013): *Database*, közlésre benyújtva.]

Az eredeti tervben szerepelt *gfp*-konstrukciók létrehozása is, azzal a céllal, hogy látványosan követhessük az ivaros reprodukcióban résztvevő gének működését. Az a tudományos főmunkatárs (dr. Nagy István) azonban, aki a tervezéskor ezt a munkatervi pontot javasolta és teljesítését vállalta, nem végzett semmi érdemi munkát a projektben, és az első év után távozott a csoportból.

E munka kiváltására ajánljuk azt a felmérést, amelynek az volt a célja, hogy megállapítsuk, milyen hatással van az ökológiai niche beszűkülése az aszexualisan szaporodó gombapopulációk diverzitására. Martonvásáron, Európa legrégebbi kukorica monokultúrák kísérletében vizsgáltuk, hogyan alakul a vezikulo-arbuszkuláris mykorrhiza (AM) populáció diverzitása olyan körülmények között, ahol a gazdanövény diverzitást 50 éve minimális szinten tartják (csak kukoricát termesztnek, s gyomok sincsenek a parcellákon). Kukorica gyökérmintákból AM-specifikus indítószekvenciák segítségével riboszóma DNS-fragmentumokat amplifikáltunk. A 257 klónozott szekvencia közül 203 *Glomeromycota* (AM) gombaszekvenciának bizonyult. Filogenetikai elemzés alapján a klónokat 22 OTU-ba (operational taxonomic unit) soroltuk; az így azonosított filotípusok az *Archaeosporaceae*, a *Glomeraceae* és a *Paraglomeraceae* családba tartoztak. A kukorica monokultúrában a *Glomus* A típusú AM gombák domináltak, de a csoporton belül változatos alcsoport megoszlásokat tapasztaltunk. Úgy gondoljuk, hogy a növényi diverzitás szélsőséges csökkenése ellenére azért maradhatott fenn sokszínű mykorrhizapopuláció ezen a területen, mert rejtett ivaros folyamatok működnek ezekben, a mai ismereteink szerint kizárólag aszexualisan szaporodó gombákban [Sasvári *et al.* (2011): *Biology and Fertility of Soils* **47**, 167-176.]